

Best Available Copy**DNA CODING HUMAN ST2, EXPRESSED PRODUCT OF THE SAME,
METHOD FOR PRODUCING EXPRESSED PRODUCT BY EXPRESSING
THE SAME**

Patent Number: JP6178687

Publication date: 1994-06-28

Inventor(s): TOMINAGA SHINICHI

Applicant(s):: SHINICHI TOMINAGA

Requested Patent: JP6178687

Application Number: JP19920353589 19921214

Priority Number(s):

IPC Classification: C12N15/12 ; C12N5/10 ; C12P21/02

EC Classification:

Equivalents: JP2732005B2

Abstract

PURPOSE: To isolate a genome DNA coding human ST2, a cDNA coding the human ST2 and the human ST2 for detecting cancer cells, preventing the multiplication of the cancer cells, etc.

CONSTITUTION: A genome DNA fragment coding human ST2 is isolated from the library of human genome DNA with the cDNA of mouse ST2 as a probe. A cDNA fragment coding a part of the human ST2 is synthesized from various human cDNA libraries with a part of the DNA fragment as a PCR primer, and a cDNA coding the whole length of the human ST2 is isolated from the human cDNA library with the cDNA fragment as a probe. The cDNA is inserted into an expression vector, and the inserted vector is transduced into a culture cell. The human ST2 is massively expressed in the cultured cells.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-178687

(43) 公開日 平成6年(1994)6月28日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/12 5/10	ZNA			
C 12 P 21/02	C 8214-4B 8931-4B 9281-4B	C 12 N 15/00 5/00	A B	
		審査請求 未請求 請求項の数12(全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願平4-353589

(22) 出願日 平成4年(1992)12月14日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年11月5日発行の「NATIONAL INSTITUTE OF GENETICS」に発表

(71) 出願人 593009929

富永 嘉一

横浜市保土ヶ谷区桜ヶ丘1丁目2番3号

(72) 発明者 富永 嘉一

横浜市保土ヶ谷区桜ヶ丘1丁目2番3号

(74) 代理人 弁理士 大滝 均

(54) 【発明の名称】 ヒトST2をコードするDNA、該DNAの発現産物、該DNAを発現させることによる発現産物の製造方法

(57) 【要約】

【目的】 ヒトST2をコードするゲノムDNA、ヒトST2をコードするcDNA、ヒトST2を単離する。これらは、癌細胞の検出、増殖抑制などに有用である。

【構成】 ヒトゲノムDNAライブラリーから、マウスST2のcDNAをプローブとして用いて、ヒトST2をコードするゲノムDNA断片を単離した。また、このDNA断片の一部をPCRプライマーとして用いて、種々のヒトcDNAライブラリーからヒトST2の一部をコードするcDNA断片を合成し、該cDNA断片をプローブとして用いて、ヒトcDNAライブラリーから、ヒトST2の全長をコードするcDNAを単離した。更に、このcDNAを発現ベクターに挿入したベクターを培養細胞に導入し、培養細胞内でヒトST2を大量に発現させた。

特許出願公開番号 特開平6-178687

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1の塩基配列を有するマウスST2のcDNAとハイブリダイズするヒトST2をコードするDNA

【請求項2】 ヒトmRNAを鏡型として合成されたcDNAである請求項1記載のDNA。

【請求項3】 ヒトゲノム由来のDNAである請求項1記載のDNA。

【請求項4】 配列番号4のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする請求項1記載のDNA。

【請求項5】 配列番号2の塩基配列を有する請求項1記載のDNA。

【請求項6】 配列番号3の塩基配列を有する請求項1記載のDNA。

【請求項7】 請求項1～6のいずれかの項に記載のDNAの少なくとも一部分を有し、ヒトST2をコードするDNAと選択的にハイブリダイズするDNA断片。

【請求項8】 請求項1～6のいずれかの項に記載のDNAを含有するベクター。

【請求項9】 請求項8に記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項10】 動物細胞である請求項9記載の形質転換体。

【請求項11】 請求項1～6のいずれかの項に記載のDNAによりコードされるヒトST2。

【請求項12】 請求項7記載の形質転換体を培養して、発現されるヒトST2を回収することを特徴とする、ヒトST2の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヒトST2をコードするDNA、該DNAの少なくとも一部分を有しヒトST2と選択的にハイブリダイズすることのできるDNA、該DNAを含有するベクター、該ベクターを保持する形質転換体、ヒトST2、該DNAを発現させてヒトST2を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 細胞分裂では、G1期と呼ばれるDNA合成準備期、S期と呼ばれるDNA合成期、G2と呼ばれる分裂準備期、M期と呼ばれる分裂期及びG0期と呼ばれる静止期が出現することが知られている。ここで、分裂を繰り返す細胞はG1期→S期→G2期→M期→G1期の増殖サイクルを繰り返すが、M期からG0期に移行した細胞は分裂の休止状態となる。しかし、G0期にある休止状態の細胞も増殖刺激等によってG1期に移行し、再び増殖サイクルに入ることができる。

【0003】 動物の組織中には、周期の異なる細胞が存在しているが、それら細胞を抽出し、G0期で分裂を停止させ、再び人為的な刺激を与えることでG0期か

らG1期への移行を開始させる技術が知られるようになるにつれて、G0期からG1期にかけて特異的に発現する遺伝子(DNA)を解明しようとする研究が盛んになっている。G0期にある細胞がG1期に移行し増殖サイクルに入る機構が明らかになれば、癌細胞等の細胞分裂の制御などに応用することが可能であり、この研究は基礎研究のみにとどまるものではない。

【0004】 実際に、従来より分裂をG0期で停止させた動物細胞標品を使用し、これに人為的な刺激を与えてG0期からG1期へ移行させ、このときに特異的に発現するRNAを抽出するなどの研究が行われている(①Linzer, D. I. H. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第30巻、4271頁(1983年)、②Linzer, D. I. H. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第81巻、4255頁(1984年)、③Hirschhorn, R. R. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第81巻、6004頁(1984年)、④Lau, L. F. ら、EMBO J. 第1巻、3145頁(1985年)、⑤Lau, L. F. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第84巻、1182頁(1987年)、⑥Chavrier, P. ら、EMBO J. 第7巻、29頁(1988年))。

【0005】 これらの研究によって、細胞がG0期からG1期へ移行する際には、例えばc-myc、c-fos等の癌遺伝子が特異的に発現することが明らかになっている。

【0006】 しかし、これらの研究はG0期からG1期への移行の際の遺伝子の発現に注目しようとするあまり、非特異的DNAを排除する目的で、G0期にある細胞を人為的に刺激した後2～3時間後という極めて短時間に特異的に発現されるDNAのみを対象としており、S期直前等で発現されるものについての知見はなかった。

【0007】 本発明者は先に、G0期にあるマウス由来の培養細胞を人為的に刺激した後、約10時間後という比較的長時間の後に特異的に発現される遺伝子に着目して研究を行った結果、マウス線維芽細胞のG0期からG1期の移行期に特異的に発現するmRNAを鏡型としてcDNAを合成することによって従来知られていなかったDNAを単離し、更には該DNAがコードする蛋白質を発現することに成功し(Tominaga, S. et al., FEBS Lett., 258, 301-304 (1989), Tominaga, S. et al., Biochem Biophys. Acta, 1090, 1-8 (1991))、この蛋白質をマウスST2と命名した。

【0008】 このマウスST2をコードするDNAを特徴付ける性質は次の通りである。

【0009】 ①少なくともマウスのCD-1種の臍組

織、心臓組織、肺組織、肝臓組織、脾臓組織、胰臓組織、腎臓組織、筋肉組織又は睾丸組織から調製される細胞では発現されないが、少なくともBALB/c-3T3(マウス線維芽細胞)細胞のG0期から開始される細胞増殖の際に発現される。すなわち、G0期(静止期)にある前記細胞では該DNAは発現されないが、これら細胞がG0期からG1期に移行するにしたがって発現される。

【0010】②少なくともマウスBALB/c-3T3細胞であってG0期を経由せずにM期からG1期を経由してS期に移行した細胞においても発現されるが、その発現量は該細胞のG0期から開始される細胞分裂における発現量以下である。すなわち、例えば分裂組織に由来する細胞では、G0期を経由せずにM期からすぐ次の細胞周期に移行することがある。このような細胞においても該DNAは発現されているが、その発現量は、G0期からG1期に移行する際の発現量と比較するとわずかである。

【0011】③G0期からの細胞増殖開始後約5~12時間でその発現は極大を迎える。すなわち、従来知られていたDNAではG0期からの分裂の開始後2~3時間程度で特異的に発現するが、該DNAはこれらとは異なる性質を有する。

【0012】④その発現により分子量が18~28Sの細胞質RNAが合成される。

【0013】このように、本発明者が先に単離したマウスST2をコードするDNAは従来知られたDNAとは異なった性質を有していた。本発明者らは更に、マウスST2をコードするcDNAの塩基配列を決定した。そして、決定された塩基配列をもとに、マウスST2の337残基からなるアミノ酸配列を推定した(Tominaga, S. et al., FEBS Lett., 258, 301-304 (1989))。このアミノ酸配列から、マウスST2の性質が次のように推定された。

【0014】①イムノグロブリン・スーパーファミリーに属し、3個のイムノグロブリン様ドメインを形成し得る一次構造を有する蛋白質である。ここで、イムノグロブリン・スーパーファミリーとは、イムノグロブリン様ドメインを持ち、細胞間連絡に関与する蛋白質であり、イムノグロブリン様ドメインとはイムノグロブリンに存在する、システイン同志のS-S結合により形成されるループと類似した構造を意味する。3個のイムノグロブリン様ドメインを形成し得るとは、少なくとも6個以上のシステイン残基を有することを意味する。

【0015】②9個の糖鎖が結合し得る部位を有する蛋白質である。該蛋白質は9個のアスパラギンを有しているからである。

【0016】③アミノ酸配列が公知であるマウスIL-1レセプター中の膜外部位、マウス神経細胞付着蛋白

質、マウス基底膜プロテオグリカン、IILA-6-2、分泌型チキンIgMを構成する重鎖中の定常部位とのアミノ酸配列類似性(アミノ酸配列の同一性)が、それぞれ25.1%、22.7%、19.0%、20.8%、16.5%である。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】このように、細胞がG0期からG1期に移行する際、移行開始後比較的長い時間の後発現するマウスST2についてはその詳細が明らかにされたが、マウスST2に類似する蛋白質、特にヒト由来の蛋白質については全く知見がなかった。

【0018】

【課題を解決するための手段】本発明者は、マウスST2 cDNA由来のDNAプローブを用いて、ヒト颗粒球由来のゲノムDNAライブリーをスクリーニングし、該DNAプローブと特異的にハイブリダイズするクローナーを得た。そして、このクローナーに含まれるゲノムDNA断片の塩基配列を明らかにし、マウスST2をコードするゲノムDNAの塩基配列との対比からエクソン部を推定した。このエクソン部の塩基配列を基に合成したPCRプライマーを用いて様々な細胞由来のヒトcDNAライブリー中のDNAを増幅し、2つのPCRプライマーで挟まれる領域が増幅されるライブリーを選択した。そして先に単離したマウスST2 cDNA断片とハイブリダイズするヒトゲノムDNA断片をプローブにして、ヒトST2をコードするcDNAをクローニングすることに成功した。

【0019】更にクローニングしたcDNAを動物細胞中で発現させ、ヒトST2を取得することに成功した。

【0020】本発明のDNAは、例えば配列番号4のアミノ酸配列を有する蛋白質を発現し得るものである。

【0021】このようなDNAの一例としては、配列番号2または配列番号3の塩基配列を有するものがあげられる。

【0022】また、本発明の蛋白質は、本発明のDNAによりコードされるものであり、その他には何ら制限はない。本発明の蛋白質の一例として、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するものがあげられる。

【0023】また、本発明の蛋白質には、「シグナルペプチドを含有するもの」と「シグナルペプチド含有しないもの(成熟蛋白質)」の両者とも含まれる。

【0024】本発明のDNAは後に示されるような手法を用いてヒト細胞より取得することが可能である。また、本発明の蛋白質は本発明のDNAを適当なベクターに連結し、これを使用して遺伝子工学的に調製することが可能である。

【0025】DNAはヒト細胞のゲノムから単離しても、ヒト細胞由来のmRNAを雰囲気とするcDNAから単離してもよい。また、化学合成によって調製することも可能である。ゲノムDNA、mRNAの採取源となる

細胞はヒト細胞であれば特に限定されないが、mRNAの場合はST2が発現している細胞から取得することが望ましい。例えば本発明のDNAの両末端に、オリゴヌクレオチドを結合させた後に適当な制限酵素を用いて制限部位を形成したDNA断片を取得し、一方選択した宿主を形質転換可能でかつ該宿主中で自己増殖可能なベクターのプロモーター等の構造遺伝子の発現に必要な配列の下流を先の制限酵素により切断したDNA断片を取得し、これらを結合させることで発現ベクターを得、該発現ベクターで形質転換された宿主細胞に本発明の蛋白質を発現させることが可能である。

【0026】本発明のDNAは、従来の宿主・ベクター系にて発現可能であるが、中でもCHOやCOS等の動物細胞を使用する発現系を使用するとよい。

【0027】本発明のDNAについては、また、その塩基配列の一部であって従来知られたDNAの塩基配列と区別可能な配列を利用してDNAプローブ等を調製することが可能である。このようなプローブを用いれば、例えば組織中の細胞分裂の盛んな細胞塊等を探知することが可能である。

【0028】現在では、既知のDNAについてその一部を欠失させ、置換し又は他の塩基を挿入することで該DNAの発現により発現される蛋白質をより低分子化（時には可溶化することもある）し、該蛋白質が有する性質を増強し又は消失させ、更には例えば一定の宿主中で発現しやすいようにするが一般的に行われている。本発明においても、本発明のDNAにこのような操作を行うことには何等制限はない。一方、既知の蛋白質についても、その一部を欠失させ、置換し又は他のアミノ酸残基を挿入することで該蛋白質をより低分子化（時には可溶化することもある）し、該蛋白質が有する性質を増強しあるいは消失させ又は新たな機能を追加する操作が一般的に行われている。前記したDNAについての操作と同様に、本発明の蛋白質についてこのような操作を行うことについては何等制限はない。

【0029】

【実施例】以下に本発明を更に詳細に説明するために実施例を記載するが、これら実施例は本発明を限定するものではない。

【0030】実施例1 ヒトST2をコードするゲノムDNAのクローニング

顆粒球由来のヒトゲノムDNAライブラリーを、マウスST2 cDNA (Tomina g a, S. et al., FEBS Lett., 258, 301-304 (1989)) (配列番号1に対応) をプローブにしてスクリーニングした (Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982) 記載の方法による)。約2X10⁶個のブラークから3個のポジティブクローンを選択し、組

換えファージを精製した。組換えファージの制限酵素切断によるマッピング、サザンハイブリダイゼーション分析、塩基配列の決定によって、3つのクローンは同一のゲノムDNA断片を含有することを確認した。

【0031】クローニングされたヒトST2をコードするゲノムDNA断片の塩基配列の一部分を、マウスST2のcDNAの塩基配列 (Tomina g a, S. et al., FEBS Lett., 258, 301-304 (1989)) と比較した。図1に示すように、該ヒトST2をコードするゲノムDNAの塩基配列の一部分は、第7エクソンの全部と第8エクソンの一部を含んでいた。図1において、□で囲った配列はエクソン部分、アステリスクは終始コドンを表す。

【0032】実施例2 ヒトST2 cDNAを含むヒトcDNAライブラリーの選択

図1 (配列番号2に対応) で示したヒトST2ゲノムDNAの塩基配列に基づいて、ヒトST2 cDNAを含むヒトcDNAライブラリーの選択に用いるPCRプライマーを設計した。該PCRプライマーは図1中の矢印で示される2種類の1本鎖DNAである。

【0033】図1から明らかのように、ライブラリー中にヒトST2 cDNAが存在すれば、PCR法による増幅によって、305塩基のDNA断片が製造される。また、ライブラリー中にヒトST2ゲノムDNAが存在すれば、PCR法による増幅によって397 bpのDNA断片が製造される。

【0034】該PCRプライマーによって、種々のヒト細胞由来のcDNAライブラリーをPCR法で増幅し、その後ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって、増幅されたDNA断片の長さを分析した。反応はTaqポリメラーゼの存在下、94°C 1分、50°C 2分、72°C 3分を30サイクル繰り返した。エチジウムプロマイドで染色されたゲルの写真を図2に示す。レーンの上にcDNAライブラリーを製造する際に用いたヒト細胞のクローン名を、レーンの右横にDNA断片の大きさを示す。17のcDNAライブラリーのうち、5つのライブラリーにおいて、305塩基のDNA断片が増幅され、これらのライブラリー中にヒトST2 cDNAが存在していることが判明した。なお、対照であるヒトゲノムDNAライブラリー (図2の最も右のレーン)においては、397塩基のDNA断片が増幅され、PCR反応が正常に行われていることが確認された。

【0035】上記5つのcDNAライブラリーのうち、2F1と5C10はコンカナバリンA (Con A) またはホルボールミリストアセテート (PMA) で活性化されるヘルパーT細胞のクローンである (Yokota, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84, 7388-7392 (1987)、Lee, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 8

7

2, 4360-4364 (1985)、Yokota, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 83, 5894-5898 (1986)。)

[0036] 実施例3 ヒトST2をコードするcDNAのクローニング

実施例2の5C10クローン由来のcDNAライブラリを、実施例2でPCR法による増幅で得られた305塩基のDNA断片をプローブとしてスクリーニングした (Maniatis T. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982) 記載の方法による)。約 7×10^5 個のコロニーから2つのポジティブクローンを得た。長いcDNA断片を有するクローンからcDNAを単離し、pUC19にサブクローニングし、全塩基配列を決定したところ、該cDNA断片は、ヒトST2の全オープンリーディングフレーム(ORF)を含んでいた。決定された塩基配列を図3に示す。図3中、配列の上段は決定された塩基配列(配列番号3に対応)を、下段は塩基配列から推定されたアミノ酸配列(配列番号4に対応)を示す。また、シグナルペプチドの推定切断部位を矢印で、N-結合型糖鎖の推定結合部位を

【化1】

▲

で、イムノグロブリン様ドメインの形成に関与すると推定されるシステインの位置を□で示す。なお、ヒトST2のアミノ酸配列から、公知の方法(Von Heijne, G., Nucleic Acids Res., 14, 4683-4690 (1986))によってシグナルペプチド領域を検索したところ、N末端から17番目のアミノ酸がシグナルペプチドを構成していることが推定された。シグナルペプチドの切断部位は図3中上向きの白抜き矢印で示す。

[0037] 本発明のDNAは後に示されるヒトST2のアミノ酸配列と他のタンパク質のアミノ酸配列とをGenBank DNAデータベース及びNBRF蛋白データベースを用いて検索した結果、ヒトST2は、ヒトIL1-R1(重複する299アミノ酸中23.7%)、ヒトIL1-R2(重複する319アミノ酸中22.9%)、ワクシニアウイルスB16R蛋白質(重複する292アミノ酸中24.3%)、ショウジョウバエCek2蛋白質(重複する187アミノ酸中23.5%)、二ワトリk1g蛋白質(重複する148アミノ酸中25.0%)とホモロジーを有していた。これらの蛋白質のアミノ酸配列を対比して図4に示す。図4中「Hu」はヒトを、「Mu」はマウスを、「Vaccinia」はワクシニアウイルスB16R蛋白質を示す。また「:」は同一のアミノ酸を、「*」は対比していないアミノ酸を、「□」は6種類のアミノ酸で保存されているアミノ

8

酸を、「▽」または「☆」は6種類のアミノ酸で保存されているイムノグロブリン様ドメインの形成に関与すると推定されるシステインを、それぞれ示す。

[0038]

実施例4 組換え培養細胞におけるヒトST2の発現

実施例3で得られた、図3に示す塩基配列を有するヒトST2 cDNAを、発現ベクターpEF-BOS (Mizushima, S. et al., Nucleic Acids Res., 18, 5322 (1990)) のBst XI部位(EF-1αプロモーターの下流に存在)に挿入した。cDNAの挿入が正しい方向で行われたかどうか制限酵素マッピングにより確認し、正しく挿入されたプラスミドをDEAE-デキストラン法(クロロキン処理も行う)によってCOS 7細胞に導入した(Sambrook, J et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 16, 30 (1989) 記載の方法による)。プラスミドを導入してから30時間後細胞を洗浄し、 35 S-メチオニンを含有する培地で発現する蛋白質を放射標識し、放射標識開始12時間後に細胞上清を回収した。上清中の蛋白質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分離し、フルオログラフィーによって、ゲル中の蛋白質の位置を確認した。図5にその結果を示す。図5中、1のレーンはヒトST2 cDNAが挿入されていないpEF-BOSで形質転換された細胞の培養上清(対照)を、2のレーンはヒトST2 cDNAが挿入されているpEF-BOSで形質転換された細胞の培養上清を示す。矢印で示される蛋白質のバンドは図3に示すヒトST2の推定アミノ酸配列から計算される分子量を有し、レーン2のみで現れていることから、ヒトST2に対応するバンドであると判定できる。このことから、ヒトST2 cDNAが挿入された発現ベクターpEF-BOSで形質転換されたCOS 7細胞は、大量のヒトST2を発現することが確認された。

[0039]

【発明の効果】 本発明のDNAは、細胞がG0期からG1期に移行する際に特異的に発現されるものである。従って、該DNAが発現して出現するRNAに対するアンチセンスRNA等を使用し、該DNAの発現を特異的に抑制することで細胞増殖に関する重要な知見を得ることが可能となる。このような効果は、本発明の蛋白質についても同様であり、例えば該蛋白質を認識する抗体を開発し、これを使用することで細胞増殖に関する重要な知見を得ることが可能である。これらのこととは、癌などの、従来有効な治療薬が知られていない疾患について、その増殖を抑制し、強いてはそのような増殖性細胞を選択的に攻撃するような薬剤を開発するために必要な基礎的技術を提供することを意味するものである。

[0040] また、これらDNAや蛋白質に対する拡散

9

10

プローブや標識抗体を使用することで組織中に存在する
癌細胞等の増殖性細胞を探知することも可能となる。 * 【0040】

配列番号：1

配列の長さ：1011

配列の型：核酸

配列の種類：cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列：No

起源

生物名：mouse

配列：

ATGATTGACA GACAGACAAAT CGGACTTTGG GCTTTCGAA TCTTGACACT TCCCATGTAT	60
TTGACAGTTA CGGAGGGCAG TAAATCGTCC TGGGCTCTGG AAAATGACGC TTAAATTGTC	120
AGATGCCUCCG AAGAGACCACG CTCAACTTAT CCTCTGGAAT GGTATTACTC AGATAACAAAT	180
AAAAAGTATTC CTACTCAAAA AAGAAATCGG ATCTTGTCT CAAGAGATCG TCTGAAGTTT	240
CTACCAAGCCA CAGTCCAAAGA CTCTGGGATT TATGCTTGTG TTATCAGAAG CCCCAACTTG	300
AATAAGACTG GATACTTGAA TCTCACCCATA CATAAAAGC CGECAAGCTG CAATATCCCT	360
GATTAATTGA TGTACTCGAC AGTACGTTGA TCAGATTAAT ATTCAAGAT AAGCTGTCCA	420
ACAATTGACC TGTATAATTG GACAGCACCT GTTGAGTGGT TTAGGAACCTG CAAAGCTCTC	480
CAAGAGCCAA GGTTCACGGC ACACAGGTCC TACTTGTCA TTGACACCGT GACTCATOAT	540
GATGAAGGTG ACTACACTTG TCAATTGACA CACCCGGAGA ATGGAACCAA CTACATCGT	600
ACGGCCACCA GATCATTCAAC AGTTGAZGAA AAAGGCTTTT CTATGTTTCC AGTAATTACA	660
AATCCCTCCAT ACAACCACAC AATGGAAGTG GAAATAGGAA AACCAAGCAAG TATTGCCCTGT	720
TCAAGCTTGCT TTGGCAAAGG CTCTCACTTC TTGGCTGATG TCTCTGGCA GATTAACAA	780
ACAGTACTTG GAAATTTGG TGAAAGCAAGA ATTCAAGAAAG AGGAAAGCTG AAATGAAAGT	840
TCCACCAATG ACATGGATTG TTAAACCTCA GTGTTAGGA TAACTOOTGT GACAGAAAAG	900
GACCTGTCCC TGGAAATATGA CTGCTGGCC CTGACCTTC ATGGCATGAT AAGGCACACC	960
ATAAGGCTGA GAAAGAAACA ACCAACTAAG GAGTGTCCCT CACACATTGC T	1011

【図面の簡単な説明】

【図5】ヒトST2のCOS7細胞での発現を示す図

【図1】ヒトST2をコードするゲノムDNAの塩基

配列の一部と、ヒトST2 cDNAを含むcDNAライ

ブラーーを選択するために用いたPCRプライマーを示

す図である。

【図2】種々のcDNAライ

T2をコードするゲノムDNAのエクソン内に含まれる

プライマーを用いてPCR法による増幅を行って得たD

NA断片を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分析

した結果を示す図である。

【図3】ヒトST2 cDNAの塩基配列及び該DNA

がコードする推定アミノ酸配列を示す図である。

【図4】ヒトST2のアミノ酸配列とヒトST2に類

似する蛋白質のアミノ酸配列とを対比した図である。

11

12

配列番号: 2

配列の長さ: 1458

配列の型: 核酸

配列の種類: Genomic DNA

ハイボセティカル配列: No.

起源

生物名: Homo sapiens

10

細胞の種類: 顆粒球

ゲノム内の位置

染色体/セグメント名: 第2番染色体

配列の特徴:

存在位置: 459..601

特徴を表す記号: exon

特徴を決定した方法: E

他の情報: 第7エクソン

20

存在位置: 602..693

特徴を表す記号: intron

特徴を決定した方法: E

他の情報: 第7イントロン

存在位置: 694..1180

30

特徴を表す記号: exon

特徴を決定した方法: E

他の情報: 第8エクソン

配列:

CTGCAGGGTG TTCATTCTGG CCAATGGTAG CCAGATCCGG TAAACATGT TTATCTCAA	60
AGTAGCTTAT GGAGAGATGA AGAGAGTTCT GTAGAAAGAT GTGGAAGAGG GCAGTTGGAA	120
AGAAAACTCTA ATTTCTAGTA GAGGCCAATC CTCTTACTAG AAATCCTTTC TAATCTAATG	180
TGGGTTGGT GAAGGCAGAA TCATGGCCT TGTTAGTTTC CCATGCAGAT GAGAATATAAG	240
TGGGAGCTGA GCTTCAAACC CACCTGGGTG AATGAAGGTA ATGGAAGCAG GGAGGAGGCA	300
GGAGAGGACA TAGAAACAGG AACGTCCTAG AGATGAGGGA GGGAGGTCTT GGTGGGGTCC	360
ATACTAAGTG TTCACTAAGG TTTTTTTT ACATTAATG GGATAAAAATG CCAGTCGGCAG	420
AACTTAATTG TATTOOAGAA TGTCTTACT CCCCTCTA GGA AAA AAC GCA AAC CTA	476

Gly Lys Asn Ala Asn Leu

13	14	
ACT TGC TCT GCT TGT TTT GGA AAA CCC ACT CAG TTC TTG GCT GCC GTC		524
Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly Thr Gin Phe Leu Ala Ala Val		
10	15	20
CTG TGG CAG CTT AAT GGA ACA AAA ATT ACA GAC TTT GGT GAA CCA AGA		572
Leu Trp Gin Leu Asn Gly Thr Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg		
25	30	35
ATT CAA CAA GAG GAA CGG CAA AAT CAA AG GTATTTTA TATTGAAGAQ		620
Ile Gin Gin Glu Glu Gly Gin Asn Gin Ser		
40	45	
AACCATCCTC TTCCCCCTTGC ACATGGTTTG CACCTGCAAA CTAGGCATTA AAAGCTAACAG		680
GTTGCCTTGT TAG T TTC AGC AAT CGG CTG GCT TGT CTA GAC ATG GTT TTA		730
Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu		
50	55	60
AGA ATA GCT CAC GTG AAC GAA GAG GAT TTA TTG CTG CAG TAC GAC TGT		778
Arg Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gin Tyr Asp Cys		
65	70	75
CTG GCC CTG AAT TTG CAT GGC TTG AGA AGG CAC ACC GTC AGA CTA AGT		826
Leu Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser		
80	85	90
AGG AAA AAT CCA AGT AAG GAC TGT TTC TCA GACT TTGATCACCT		870
Arg Lys Asn Pro Ser Lys Glu Cys Phe Stop		
95	100	
GAACCTTCTC TAGCAAGTGT AAGCAGATA GAGTGTGOTT CCAAGAGATC CATCAAGACA		930
ATGGGAATCG CCTGTGCCAT AAAATGTGCT TCTCTTCTTC AGGATGTTGT TTGCTGTCTC		990
ATCTTGTAG ACTGTTCTG TTTGCTGGGA CCTTCTCTGC TGCTTAAATT GTTGTCTC		1050
CCCCACTCCC TCCTATCGTT GGTTTGTCTA GAACACTCAG CTGCTTCTT GGTCAATCCTT		1110
GTTCCTAAC TTTATGAAC CCCTCTGTGT CACTGTATGT GAAAGGAAAT GCACCAACAA		1170
CCGTAACCTG AACGTGTTCT TTTGTGCTCT TTTATAACTT GCATTACATG TTGTAAGCAT		1230

15

16

GGTCCGTCT ATATGTTTT CTGGTCATAA TGAACACTCA TTTGTTAGC GAGGGTGTA	1290
AACTGAACAA AAAGGGGAAG TATCAAACTA CTGCCATTTC AGTGAGAAAA TCCTAGGTGC	1350
TACTTITATAA TAAGACATTI GTTAGGCCAT TCTTGCATTG ATATAAACAA ATACCTGAGA	1410
CTCGGTGATG TATATGAAAAA GAGGTTTAAT TGGCTCACCG TTCTGCAG	1458

配列番号：3

配列の長さ：1357

配列の型：核酸

配列の種類：cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列：No

起源

生物名：Homo sapiens

細胞の種類：繊維芽細胞

セルライン：BALB/c-3T3

直接の起源

ライブラリーネーム：5C10

配列の特徴：

存在位置：47..1083

特徴を表す記号：CDS

特徴を決定した方法：P

他の情報：遺伝子産物＝ヒトST2タンパク質

存在位置：47..97

特徴を表す記号：sig peptide

特徴を決定した方法：P

他の情報：遺伝子産物＝ヒトST2タンパク質

存在位置：98..1090

特徴を表す記号：mat peptide

17

18

特徴を決定した方法: P

他の情報: 遺伝子産物=ヒトST2タンパク質

配列:

ATCTCAACAA CGACTTACCA ATACTTGCTC TTGATTGATA AACAGA ATG GGG TTT	55
Met Gly Phe	
TGG ATC TTA GCA ATT CTC ACA ATT CTC ATG TAT TCC ACA GCA GCA AAC	103
Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr Ala Ala Lys	
5 10 15	
TTT AGT AAA CAA TCA TGG GGC CTG GAA AAT GAG GCT TTA ATT GTC AGA	151
Phe Ser Lys Glu Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val Arg	
20 25 30 35	
TGT CCT AGA CAA GGA AAA CCT AGT TAC ACC GTG GAT TGG TAT TAC TCA	199
Cys Pro Arg Glu Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr Tyr Ser	
40 45 50	
CAA ACA AAC AAA AGT ATT CCC ACT CAG GAA AGA AAT CGT GTG TTT GCC	247
Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val Phe Ala	
55 60 65	
TCA GGC CAA CTT CTG AAG TTT GTC CCA CCT GAA GTT GCT GAT TCT GGT	295
Ser Gly Glu Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Glu Val Ala Asp Ser Gly	
70 75 80	
ATT TAT ACC TGT ATT GTC AGA AGT CCC ACA TTC AAT AGG ACT GGA TAT	343
Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg Thr Gly Tyr	
85 90 95	
GCG AAT GTC ACC ATA TAT AAA AAA CAA TCA GAT TGC AAT GTT CCA GAT	391
Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn Val Pro Asp	
100 105 110 115	
TAT TTG ATG TAT TCA ACA GTC TCT GGA TCA GAA AAA AAT TCC AAA ATT	439
Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn Ser Lys Ile	

(11)		
19		20
120	125	130
TAT TGT CCT ACC ATT GAC CTC TAC AAC TGG ACA GCA CCT CTT GAG TGC		
Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Leu Glu Trp		
135	140	145
TTT AAG AAT TGT CAG GCT CTT CAA GCA TCA AGG TAC AGG GCG CAC AAG		
Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala His Lys		
150	155	160
TCA TTT TTC GTC ATT GAT AAT CTG ATC ACT GAG GAC GCA GGT GAT TAC		
Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Gln Asp Ala Gly Asp Tyr		
165	170	175
ACC TGT AAA TTT ATA CAC AAT GAA AAT GCA GCG AAT TAT AGT GTG ACG		
Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr Ser Val Thr		
180	185	190
GGC ACC AGG TCC TTC ACG GTC AAG GAT GAG CAA GGC TTT TCT CTG TTT		
Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Gln Gln Gly Phe Ser Leu Phe		
200	205	210
CCA CTA ATC GGA GCC CCT GCA CAA AAT GAA ATA AAG GAA GTG GAA ATT		
Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu Val Glu Ile		
215	220	225
GGA AAA AAC GCA AAC CTA ACT TCC TCT GCT TGT TTT GGA AAA GCC ACT		
Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly Thr		
230	235	240
CAG TTC TTG CCT GCC GTC CTG TGG CAG CTT AAT GCA ACA AAA ATT ACA		
Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr Lys Ile Thr		
245	250	255
AAC TTT GGT GAA CCA AGA ATT CAA CAA GAG GAA GGG CAA AAT CAA AGT		
Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln Asn Gln Ser		
260	265	270
TTC AGC AAT GGG CTG GCT TGT CTA GAC ATG GTT TTA AGA ATA GCT GAC		
		275
		919

21

22

Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg Ile Ala Asp		
280	285	290
CTG AAG GAA GAG GAT TTA TTG CTG CAG TAC GAC TGT CTG CCC CTG AAT		967
Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Glu Tyr Asp Cys Leu Ala Leu Asn		
295	300	305
TTG CAT GCC TTG AGA AGG CAC ACC GTA AGA CTA AGT AGG AAA AAT CCA		1015
Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg Lys Asn Pro		
310	315	320
AGT AAC GAG TGT TTC TCA GACTTG ATCACCTGAA CTTCTCTAG CAACTGTAAG		1070
Ser Lys Glu Cys Phe Stop		
325		
CAGAACGGAG TGTGGTTCCA AGAGATCCAT CAAGACAATG GGAATGGCCT GTGCCATAAG		1180
ATGTGCTTCT CTTCTTCGGG ATGTTGTTTG CTGTCGATC TTGTTAGACT GTTCCCTGTT		1190
GCTGGGAGCT TCTCTGCTGC TTAAATTGTT CGTCCTCCCC CACTCCCTCC TATCGTTGGT		1250
TTGTTCTAGAA CACTCAGCTG CTTCTTTGGT CATCCTTGTGTT TTCTAACTTT ATGAACTCCC		1310
TCTGTGTAC TGTATGTGAA AGGAAATGCA CCAACAAACCG AAAACTG		1357

配列番号：4

配列の長さ：328

配列の型：アミノ酸

配列の種類：タンパク質

ハイボセティカル配列：No

起源

生物名：Homo sapiens

配列の特徴

特徴を表す記号：Protein

存在位置：18..328

特徴を決定した方法：P

配列：

23

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr

5

10

15

Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu

20

25

30

Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp

35

40

45

Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg

50

55

60

Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Glu Val Ala

65

70

75

80

Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg

85

90

95

Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn

100

105

110

Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn

115

120

125

Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Thr Ala Pro

130

135

140

Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg

145

150

155

160

Ala His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala

165

170

175

Gly Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala, Asn Tyr

180

185

190

Ser Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe

195

200

205

Ser Leu Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Gln Ile Lys Glu

210

215

220

Val Glu Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly

25

225	230	235	240
Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr			
245	250	255	
Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Gln Glu Gly Gln			
260	265	270	
Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg			
275	280	285	
Ile Ala Asp Val Lys Gln Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu			
290	295	300	
Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg			
305	310	315	320
Lys Asn Pro Ser Lys Glu Cys Phe			
325			

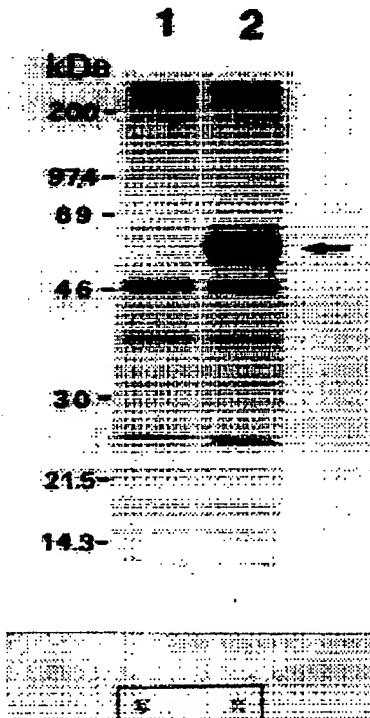
[図1]

26

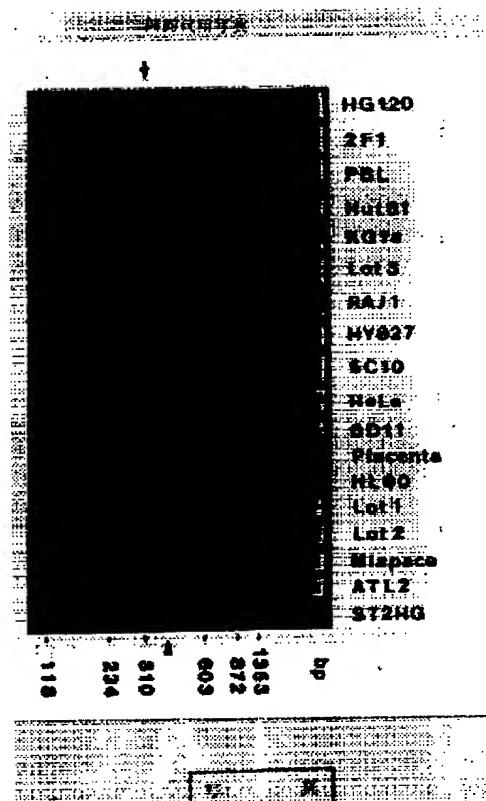
ACTCCCCTCTAGGAAAAAACGCAAACCTAACTTGCTCTCCITGTTTGGAAAAGCCACTC
AGTTCTTGGCTGGGTCTGTGGCAGCTTAATGGAACAAATTACAGACTTTGGTGAAC
CAAGAATTCAACAAGAGGAAGGGCAAAATCAAACGTTATTTTATATTGAAGAGAACCATC
CTCTTCCCCTTGACATGGTTGCACCTGCAAAGTAGGCATTAAAGTAACAGGTTGCTT
TCTTAGTTTCAGCAATGGGCTGGCTTGTCTAGACATGTTAAGAATAGCTGACGTGAA
GGAACAGGATTATTGCTGCACTACGACTGTCTGGCCCTGAATTGGCATGGCTTGAGAAG
GCACACCGTAAGACTAAGTAGGAAAAATCCAAGTAAGGAGTGTCTGAGACTTTGATCA
CTTCATTCCCTCACAAAGACT

CTTCATTCCCTCACAAAGACT

[図5]



【図2】



【図3】

ATC CGG TTT TCG ATC TTA GCA AAT CTC AGA ATT CTC ATG TAT TCC GCA GCA GCA AAG TTT AGT AAA CAA 68
 Met Cys Phe Tyr Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr Ile Ala Lys Phe Ser Lys Cys 73
 TCA TGG CGC CTG GAA AAT GAG GCT TTA ATT GTC AGA [TGT] CCT AGA CAA GGA AAA CCT ACT TAC ACC GTG 108
 Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val Arg [Cys] Pro Arg Glu Cys Lys Pro Ser Tyr Thr Val 146
 GAT TGG TAT TAC TCA CAA AGA AAC AAA AGT ATT CCC ACT CAG GAA AGA AAT GGT GTG TTT GCC TCA GGC 207
 Asp Tyr Tyr Ser Glu Thr Asp Lys Ser Ile Pro Glu Glu Arg Val Phe Ala Ser Cys 69
 CAA CCT CTC AAG TTT CTA CCA GCT GAA GTT GCT GAT ATT TAT ACC [TGT] ATT GTC AGA AGT CCC 216
 Glu Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Glu Val Ile Asp Ser Cys Ile Tyr Thr [Cys] Ile Val Arg Ser Pro 92
 ACA TTC AAT AGG ACT CGA TAT CCC AAT CTC ACC ATA TAT AAA AAA CAA TCA CAT TCC AAT GTT CCA GAT 145
 Thr Phe Asp Arg Tyr Ala Asp Val Thr Ile Tyr Lys Glu Cys Ser Asp Cys Asn Val Pro Asp 115
 TAT TTG ATG TAT TCA ACA GCA GTC TCT GGA TCA GAA AAA AAT TCC AAA ATT TAT [TGT] CCT ACC ATT AAC CTC 414
 Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Cys Ser Glu Lys Asn Ser Lys Ile Tyr [Cys] Pro Thr Ile Asp Leu 138
 TAC AAC TCG AGA CCA CCT CTT GAG TGG TTT AAG AAT TGT CAG GCT CTT CAA GGA TCA ACC TAC AGG CCC 483
 Tyr Asp Tyr Thr Ala Pro Leu Glu Tyr Phe Lys Asn Cys Glu Ala Leu Glu Gly Ser Arg Tyr Arg Ala 161
 CAC AAC TCA TTT TTG GTC ATT GAT AAT GTG ACT GAG GAC GCA GGT GAT TAC ACC [TGT] AAA TTT ATA 552
 His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala Gly Asp Tyr Thr [Cys] Lys Phe Ile 184
 CAC AAT GAA AAT GGA GGC AAT TAT ACT GTG ACC GGC ACC AGC TCC TTC ACC GTC AAC GAT GAC CAA GGC 621
 His Asn Glu Asn Gly Ile Asn Tyr Ser Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Glu Gly 207
 TTT TCT CTG TTT CCA ATC CCA CCC CCT CCA CAA AAT CAA ATA AAC CAA CTC CAA ATT GGA AAA AAC 690
 Phe Ser Leu Phe Pro Val Ile Cys Ala Pro Ala Glu Asn Glu Ile Lys Glu Val Glu Ile Cys Lys Asn 230
 CCA AAC CTA ACT [TGC] TCT CCT TGT TTT GGA AAA GGC ACT CAG TTC TTC GCT GCC CTC CTC TGG CAG CTT 759
 Ala Asn Leu Thr [Cys] Ser Ala Cys Phe Gly Lys Thr Glu Phe Leu Ala Asn Val Leu Tyr Glu Leu 253
 AAT GGA AGA AAA ATT ACA GAC TTT GGT GAA CCA AGA ATT CAA CAA GAG GAA GGG CAA AAT CAA AGT TTC 828
 Asn Gly Thr Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Glu Glu Glu Gly Glu Asn Glu Ser Phe 276
 AGC AAT GGG CTG CCT TGT CTA GAC ATG CTT TTA AGA ATA GCT GAC AGG GAG GAT TTA TTG CTG 897
 Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu 299
 CAG TAC GAC [TGT] CTG GCC CTG AAT TTG CAT GGC TTG AGA AGG CAC ACC GTC AGA CAA AGT AGG AAA AAT 966
 Glu Tyr Asp [Cys] Leu Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg Lys Asn 322
 CCA ACT AAG GAG TGT TTC TGA GACT TTGATCACCTGAACTTTCTCTAGCAAGTGATAGCAGAATGGAGTGTGGTTCCAACAGAT 1050
 Pro Ser Lys Glu Cys Phe End 328
 CCATCAAGACAAATGGAAATGGCTGTCATAAAATGTCCTCTCTTCCTGGGATGTTGTTGGTGTCTGATCTTGTAGACTGTTGCTG 1141
 TTTCCTCCGACCTTCTCTGCTGCTTAATGTTGCTCTCCCTCCACTGCCCTCTATGCTGTTGCTAGAACACTCAAGCTGCTTCTTGC 1232
 GTCATCTTGTCTTCTAACTTATCAACTCCCTCTGCTCACTCTATCTGAAACCAATCCACCAACAACCCCCTGCTG 1311

【図4】

【手続補正書】

【提出日】平成5年7月19日

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正内容】

【図2】種々のcDNAライブラリーに対し、ヒトS T2をコードするゲノムDNAのエクソン内に含まれるプライマーを用いてPCR法による増幅を行って得たDNA断片を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分析

した結果を示す図である（電気泳動写真）。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図5

【補正方法】変更

【補正内容】

【図5】ヒトST2のCOS7細胞での発現を示す図
である（電気泳動写真）。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁵

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

//(C 1 2 N 5/10

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)